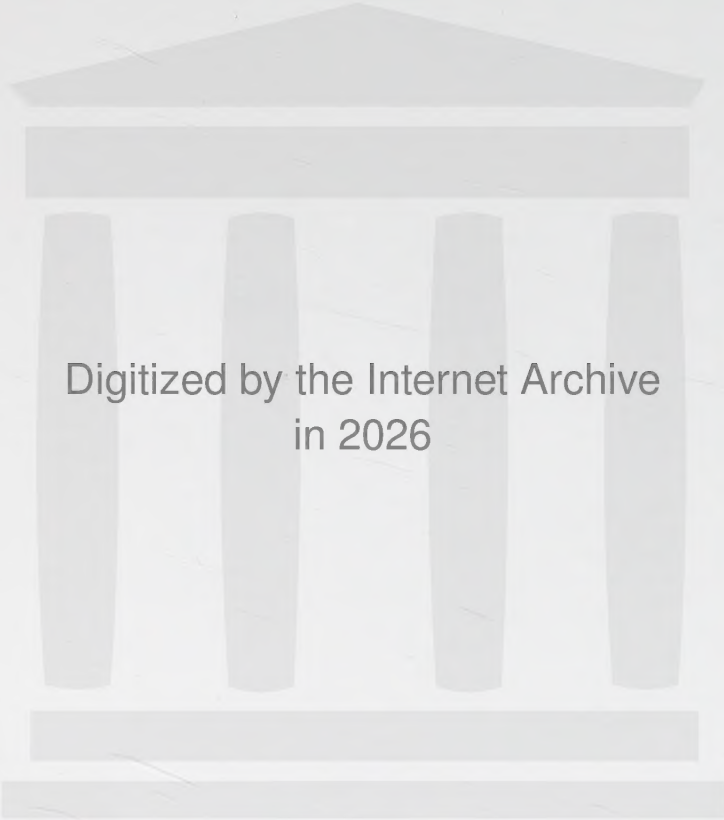


**Quantitative Veränderung der Eigenfluoreszenz
der menschlichen Haut nach
Histamineinwirkung**

Klaus Radtke

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0066

Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und
Klimatologie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Drexel

Quantitative Veränderung der Eigen-
fluoreszenz der menschlichen Haut
nach Histamineinwirkung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Radtke
aus München

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. H. Drexel

Mitberichterstatter: Dr.rer.nat. H. Pratzel

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1974



MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
A. Problemstellung	1
B. Zur Fluoreszenzmessung	2
C. Spezielle Problematik	4
D. Zur Histaminapplikation	4
E. Histamin	5
1. Vorkommen von Histamin im Organismus	5
2. Biochemie des Histamins	6
3. Physiologie des Histamins	7
F. Gefäßabdichtende Mittel	8
II. DER HAUTSPEKTRALFLUOROGRAPH	10
A. Technische Erläuterungen	10
B. Verschiedene Methoden der Meßtechnik	12
1. Aufnahme von Remissionsspektren	12
2. Zur Aufnahme von Excitationsspektren	12
3. Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren	12
4. Zur Aufnahme von kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektren	13
III. METHODIK	14
A. Fluoreszenzmessung	14
1. Aufnahme eines kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektrums	14
2. Fluoreszenzmessungen zur Ermittlung der FI-Änderung vor und nach gesetztem Hautdefekt	15
3. FI-Zeitmessungen über den fluorometrischen Verlauf eines gesetzten Hautdefekts	16
4. Standardmessungen	17

	Seite
B. Histaminapplikation	18
1. Mit Iontophorese	18
2. Ohne Iontophorese	18
C. Rutosidapplikation	19
1. In Form von Salben	19
2. In Form von Lösungen	19
D. Entfernung des Stratum corneums	19
E. Auswertung der Versuchsergebnisse	20
IV. VERSUCHSERGEBNISSE	21
A. Fluoreszenzänderungen an der Hautoberfläche durch Histaminapplikation	21
B. Fluoreszenzmessungen über den zeitlichen Verlauf der durch Histaminapplikation gesetzten Hautverletzung ad restitutionem cutis	24
C. Der Einfluß von Rutosiden auf die durch Histamin veränderte Hautfluoreszenz	24
1. Qualitative und quantitative Prüfung des Hautspektrums nach Applikation von 4 %iger Venoruton-Salbe mit der Trägersubstanz Nipasol	24
2. Prüfung des Hautspektrums nach Nipasolapplikation	25
3. Rutosidapplikation auf die durch Histamin veränderte Haut	26
4. Rutosidapplikation in Form von Venoruton injectabile 1 : 100 am Stratum granulosum	27
D. Fluoreszenzänderungen am Stratum granulosum nach Applikation von Histamin und Wasser	28

	Seite
1. FI-Veränderungen hinsichtlich des ersten Gipfels	28
2. FI-Veränderungen hinsichtlich des zweiten Gipfels	30
V. DISKUSSION	33
VI. ZUSAMMENFASSUNG	43
VII. LITERATUR	46

IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

DPNH	Diphosphopyridinnucleotid
Exc	Excitation
FI	Fluoreszenzintensität
Flu	Fluoreszenz
KFES	Kombinierte Fluoreszenz-Excitationsspektren
M	Monochromator
NADH	Nicotin-adenin-dinucleotid
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
UV	Ultraviolett
VP	Versuchsperson

I. EINLEITUNG

A. Problemstellung

Histamin gehört zu den biogenen Aminen, die beim Ablauf von Lebensvorgängen im Tier, Pflanzen und Mikroorganismen entstehen und ist auf Grund seiner pharmakodynamisch hohen Aktivität für die Physiologie der menschlichen Haut von großer Bedeutung. Histamin ist wie auch Serotin zunächst zellulär gebunden und kann durch verschiedene exogene oder endogene Hautreize freigesetzt werden, wodurch es zu einer starken Vasodilatation in der Blutendstrombahn und damit zu einer Erhöhung der Hautdurchblutung kommt.

Nach Einbringung von Histamin in die menschliche Haut beobachtete Atzinger, daß die Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut bei 450 nm (Anregung bei 360 nm) deutlich absank. Er kommt zu der Schlußfolgerung, daß die durch Histamineinwirkung erreichte Vasodilatation zu einer offensichtlich vermehrten Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes im Epidermisgewebe führt, wobei eine offenbar durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) verursachte Eigenfluoreszenz der Haut abnimmt.

Es ist bekannt, daß die histaminbedingte Vasodilatation individuell deutliche Unterschiede, sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer Dauer, zeigt. Andererseits weiß man, daß durch exogene, besonders thermische Reize, die "vasodilatatorische Reaktivität" beeinflußt werden kann. Es besteht Interesse daran, solche Effekte zur Verlaufsbeobachtung physikalisch-therapeutischer Maßnahmen zu verfolgen.

Von diesen Gedanken ausgehend sollte ein Test erarbeitet werden, der es gestattet, die reaktive Potenz auf einen Histaminreiz zu messen, wobei die Eigenfluoreszenz der

Hautoberfläche als Meßgröße verwendet werden sollte. Es soll untersucht werden, ob Anstiegs- und Abstiegsflanke der Fluoreszenzänderung nach Histaminreiz zu reproduzierbaren Resultaten über eine "sogenannte Reaktivität" führen.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die histamininduzierte Änderung der Hauteigenfluoreszenz, also die Erfolgsgröße der Histaminreaktion, durch Stoffe, welche diese Reaktion hemmen, nachweisbar zu beeinflussen sind. Die Reaktion auf ein rutosidhaltiges Präparat sollte untersucht werden.

Bevor ich auf spezielle Probleme der Messung der Fluoreszenz an der Hautoberfläche nach Einbringung von Histamin in die Haut eingehe, soll eine allgemeine Darstellung der Fluoreszenz aus physikalischer Sicht gegeben werden.

B. Zur Fluoreszenzmessung

Fluoreszenz ist eine Erscheinung, die bei festen Körpern, Flüssigkeiten und Gasen vorkommt. Auftreffendes Licht wird teilweise absorbiert und als Strahlung geringerer Energie wieder emittiert.

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um eine physikalische Eigenschaft der Materie. Atome oder Moleküle werden in einen angeregten Zustand gebracht, und beim Zurückkehren in den Grundzustand wird eine definierte Energie frei (z. B. in Form von Wärme oder Licht). Dieser Vorgang soll vereinfacht an einem Atom erläutert werden. Ein Elektron, das um einen Atomkern kreist, tut dies auf einer ganz bestimmten Bahn. Jeder dieser sogenannten Quantenbahnen entspricht ein ganz bestimmter Energiebetrag E . Um das Elektron auf eine weiter außen gelegene Bahn zu heben, muß ein bestimmter Energiebetrag, die Anregungsenergie,

zugeführt werden. Nach einer mittleren Zeit von 10^{-8} sec. springt das Elektron von seiner energetisch höheren Quantenbahn spontan wieder auf eine energetisch tiefere Bahn und schließlich auf die Grundbahn zurück, wobei die Differenz der Energien der Anfangsbahn E_a und der Endbahn E_e als Spektrallinie der Frequenz ν nach der Bohrschen Frequenzbedingung

$$E_a - E_e = h\nu$$

emittiert wird, wobei h das Plancksche Wirkungsquantum ist. Die Anregungsenergie kann von schnellen Teilchen (Elektronen usw.) oder auch von hochenergetischen Strahlungen stammen (UV-Licht, Röntgenstrahlung).

Bei Molekülen ist dieses Bild nicht mehr so übersichtlich, vor allem bei großen organischen Molekülen, da es hier weit mehr Möglichkeiten der Anregung und damit auch der Emission gibt.

Die Fluoreszenz wird in vielfältiger Weise zu analytischen Zwecken verwendet, da sie zu den empfindlichsten Meßmethoden gehört.

Man erkennt den eingeschlossenen, gelösten oder absorbierten Stoff an seinem charakteristischen Fluoreszenzspektrum (Beurteilung der Farbe oder exakte Vermessung der spektralen Verteilung der emittierten Intensität bei verschiedenen Anregungen). Es lassen sich z. B. noch 10^{-10} g Fluoreszein oder Anthrazen in einem cm^3 Lösung nachweisen.

Ein wesentlicher Vorteil liegt darin, daß es sich um eine kalte Emission handelt, was eine Untersuchung von lebenden Zellen möglich macht. Fluoreszierende Verbindungen sind in lebenden Zellen, vor allem bei Mikroorganismen, zum Studium grundlegender Phänomene der Inter-

mediär-Struktur gemessen worden. Quantitative Untersuchungen über die Fluoreszenz der menschlichen Haut könnte nach Entwicklung eines geeigneten Meßgerätes, dem Hautspektralfluorographen nach Pratzel, begonnen werden.

In dieser Arbeit soll die Fluoreszenzanalyse mit dem Hautspektralfluorographen als Indikation zur Verfolgung von Stoffwechselvorgängen, und zwar der histaminbedingten Reaktionen, an der intakten menschlichen Haut dienen.

C. Spezielle Problematik

Besondere Probleme treten bei der quantitativen Fluoreszenzbeurteilung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut auf. Es ist nicht bekannt, in welchem Bereich der Epidermis, in welcher Tiefe die fluoreszenzbeeinflussenden Vorgänge ablaufen. Somit wird mit der Fluoreszenzänderung nicht nur die Konzentrationsänderung einer fluoreszierenden Verbindung, sondern auch die Konzentrationsänderung der Substanzen miteffaßt, die Anregungslicht oder Emissionslicht absorbieren. Allein eine Verlagerung eines fluoreszierenden Substanzpools führt zu einer Änderung der Hautoberflächen-Fluoreszenz.

D. Zur Histaminapplikation

Meine Untersuchungen an der durch Histamin veränderten Haut sollen als Anknüpfung an die Dissertation von Atzinger weitere Aufklärung über das Phänomen der Hauteigenfluoreszenz erbringen.

Weiterhin interessierte uns speziell der Effekt der durch Histaminapplikation erreichten Vasodilatation, zumal bekannt war, daß durch Histamineinwirkung auf die Haut eine Abnahme der Fluoreszenz im Bereich eines Peaks auftritt, der vermutlich durch den Gehalt des Gewebes an reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) bedingt ist.

Da die Histaminreaktion einige Konkurrenzreaktionen, z.B. vermehrte Ausschüttung von Antihistaminika, auslöst, durch deren Effektivität die Histaminreaktion gehemmt wird, sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob die Intensität der Hemmung aus einer zeitlichen Beobachtung der jeweiligen Änderung der Hautdurchblutungsgröße oder der damit gekoppelten DPNH-Fluoreszenz abgeleitet werden könnte, d. h., ob der Weg vom gesetzten Hautdefekt bis zu seiner Rückbildung mitverfolgt werden kann.

E. Histamin

1. Vorkommen von Histamin im Organismus

Man weiß, daß Histamin in gebundener und gelöster Form in Arteriolen, Kapillaren, Schweißdrüsen und Mastzellen vorliegt. Der Blutplasmaspiegel für Histamin beträgt beim gesunden Menschen durchschnittlich $5,6 \mu\text{g/Liter}$. GIDON und BEALL fanden bei Asthmatikern die Histaminkonzentration auf im Mittel $7,5 \mu\text{g/Liter}$, bei Patienten mit der kalten Urtikaria nach Kontakt mit Eis oder kaltem Material bis auf $28 \mu\text{g/Liter}$ Blutplasma erhöht.

Eine weit größere Rolle spielt die Histaminkonzentration bei einer Reihe von Hauterkrankungen, die am besten durch eine Zusammenstellung von LENNART JUHLIN verdeutlicht wird:

Diagnosis	No. of subjects	Histamine base $\mu\text{g/g}$ fresh skin			
		Affected		Normal appearing	
		Range	Mean $\pm$ s. e. m.	Range	Mean $\pm$ s. e. m.
Healthy subjects	15	—	—	1.4–5.8	3.9 $\pm$ 0.4
Atopic dermatitis	12	4.6–23.5	10.6 $\pm$ 1.6	2.9–17.4	10.8 $\pm$ 1.7
Eczema	16	1.2–13.9	5.4 $\pm$ 0.9	1.8–13.3	5.1 $\pm$ 0.9
Eczema Allergic patch test	6	5.3–13.1	9.3	2.1–8.0	4.9
Eczema Positive light test (360 m μ)	2	6.9–7.7	7.3	1.8–3.0	2.4
Lichen planus	6	1.3–8.6	3.7	1.2–5.8	3.0
Pityriasis rosea	3	1.1–2.8	2.1	1.9–3.6	2.9
Pruritus	8	2.3–12.2	7.6 $\pm$ 1.2	—	—
Psoriasis	15	1.1–5.5	5.0 $\pm$ 0.8	1.7–6.8	4.8 $\pm$ 0.5
Purpura	3	2.9–5.8	4.2	1.9–4.1	3.2
Urticaria (recidivating)	18	1.0–25.0	7.1 $\pm$ 2.1	1.7–16.1	6.4 $\pm$ 1.7
Urticaria pigmentosa	3	2.2–3.0	7.0	3.4–5.7	4.9
Pigmented nevi	5	2.3–4.1	3.3	—	—

ZACHARARIAE fand bei der spektralfluorometrischen Untersuchung von zehn am Erythema multiforme exsudativum erkrankten Patienten eine Histaminkonzentrationserhöhung in der Haut von durchschnittlich 11 µg/g.

Die Histaminproduktion konnte bis jetzt nur in Mastzellen nachgewiesen werden. Mastzellen sind vulnerable Zellen, die unter Einwirkung einer ganzen Reihe von Reizen (Wärme, Kälte, ultraviolettes Licht usw.) durch Degranulierung ihrer metachromatischen Körnchen (Granula) neben anderen biologisch aktiven Substanzen Histamin freisetzen. UVNÄS bestätigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Mastzellendegranulierung und der Histaminfreisetzung. RILEY und WEST fanden eine positive Beziehung zwischen Histaminbestand und der Zahl der Mastzellen.

Im Stratum corneum und Stratum granulosum der gesunden oder erkrankten menschlichen Haut konnte bisher kein Histamin nachgewiesen werden.

Ob von außen in die Haut induziertes Histamin eine Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Histamin auslöst, konnte noch nicht geklärt werden. KARLSON und andere behaupten, daß extrazelluläres Histamin nicht intrazellulär eingelagert werden könne.

2. Biochemie des Histamins

Histamin ist ein Decarboxylierungsprodukt der Aminosäure Histidin. Dabei ist die Histidindecarboxylase wirksam. Das Enzym wird durch die Urocaninsäure gehemmt. Es wird von der Diaminoxydase (einem Flavoprotein) zum Aldehyd + NH₃ abgebaut und damit inaktiviert. Die Reaktion entspricht der oxydativen Desaminierung der Aminosäuren (KARLSON, HARPER H.A.)

3. Physiologie des Histamins

Histamin ist ein lokal wirksames Gewebshormon mit stark vasodilatatorischer Wirkung und damit Erhöhung der Hautdurchblutung. Bei einer erhöhten Freisetzung von Histamin kommt es durch ein Zusammenziehen der Endothelien in den Kapillaren zur Bildung von Spalten und somit zu einem erhöhten Flüssigkeits- und Proteinaustritt (Quaddelbildung, Max SCHNEIDER).

SCHÜTZ bezieht die Hautrötung bei Sonnenbrand auf eine durch Zellschädigung erhöhte Histaminfreisetzung. Eine spezielle Histidindecaboxylase ist in den meisten Zellen nachgewiesen (HARPER H.A.).

Neben Serotonin ist Histamin als pharmakologisch aktive Mediatorenschubstanz bei vielen anaphylaktischen Reaktionen beteiligt (SIEGENTHAL).

Zu den durch Histamin ausgelösten hyperergischen Sofortreaktionen zählt HANSEN und WERNER die Kontraktion der Bronchiolen (Asthma bronchiale) und der glatten Muskulatur, Blutdruckabfall, Kapillarlähmung mit Ödembildung, die Urticaria und Hautjucken.

Da Histamin in allen adrenergen Fasern des Sympathicus neben Adrenalin und Noradrenalin nachgewiesen wurde, schließt SCHNEIDER M. die Möglichkeit ein, daß Histamin auch eine gewisse Rolle in der Erregungsübertragung des Nervensystems spielt.

Weiterhin ist Histamin für die Magensäureproduktion mitverantwortlich, indem es durch direkte Einwirkung auf die Parietalzellen die Permeabilität für H^+ - und Cl^- -ionen erhöht (SCHÜTZ).

F. Gefäßabdichtende Mittel

Da das in meinen Versuchsreihen in die Haut induzierte Histamin neben einer lokalen Hyperämie auch eine Exsudation mit Bläschenbildung verursachte, versuchten wir einen fluorometrischen Nachweis für eine zeitlich schnellere Rückbildung der gesetzten Hautverletzung durch Behandlung mit antiexsudativen, antiphlogistischen und damit auch antiallergischen Mitteln zu erreichen. Es handelt sich dabei um folgende Stoffgruppen:

Calciumverbindungen, die stark gefäßabdichtende und entzündungshemmende Wirkung haben.

Aescin, ein Triterpenglucosid aus Roßkastanien mit ausgeprägt entzündungshemmender Wirkung.

Ferner Rutin, ein Rhamnoglucosid des Quercetins mit ebenfalls gefäßabdichtenden und entzündungshemmenden Eigenschaften.

Wir entschieden uns für das von der Firma ZYMA hergestellte halbsynthetische Flavonoid (Venoruton) in Form von Salben und Lösungen verschiedener Konzentrationen, ein Rutosid, das sich durch Hydroxyäthylierung in ein Gemisch von O-Hydroxy-äthyl-Rutosiden zerlegen läßt. Mit Hilfe der Papierchromatographie konnten P. COURBAT, G. UHLMANN und R. GÜRNE fünf Hauptkomponenten isolieren:

1. Tetra-O-hydroxyäthyl - 5,7,3'',4''-rutosid
2. Tri-O-hydroxyäthyl - 5,7,4''-rutosid
3. Tri-O-hydroxyäthyl - 7,3',4''-rutosid
4. Di-O-hydroxyäthyl - 7,4''-rutosid
5. Mono-O-hydroxyäthyl - 4''-rutosid

Als Salbengrundlage diente uns der Trägerstoff Nipasol. In einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Arbeiten (u.a. GOODMAN und GILLMAN, BÜHM 1967) wurde dieser

vasoaktive Stoff wegen seiner Wasserlöslichkeit und seiner guten perkutanen und peroralen Resorption auf seine medizinische Wirksamkeit bei Kapillarschäden mit Ödembildung und Fehlstellung der peripheren Mikroirkulation geprüft. In den letzten Jahren folgten weitere Publikationen von FITZGERALD, ELAZAR und anderen. LUND, FAGRELL, KUNICKI und GLENN stellten unter Rutosidbehandlung eine deutliche Hemmung von postischämischen, rein venösen und mechanisch hervorgerufenen Ödemen, die sie in Rattenschwänze induziert hatten, durch Volumenbestimmung fest.

II. DER HAUTSPEKTRALFLUOROGRAPH

Neben der allgemeinen Analyse über die Entstehung der Fluoreszenzstrahlung und seine Anwendbarkeit in der medizinischen Diagnostik halte ich es weiter für notwendig, einige Erläuterungen und Probleme über die hier verwendete Fluoreszenzmeßtechnik und einige wichtige Daten über den von PRATZEL entwickelten und beschriebenen speziellen Hautspektralfluorographen wiederzugeben.

A. Technische Erläuterungen

Eine Ansicht von oben auf den Spektralfluorometer soll eine Vorstellung davon geben, wie die optischen Elemente auf einer Gußplatte von 87 x 193 cm untergebracht sind.

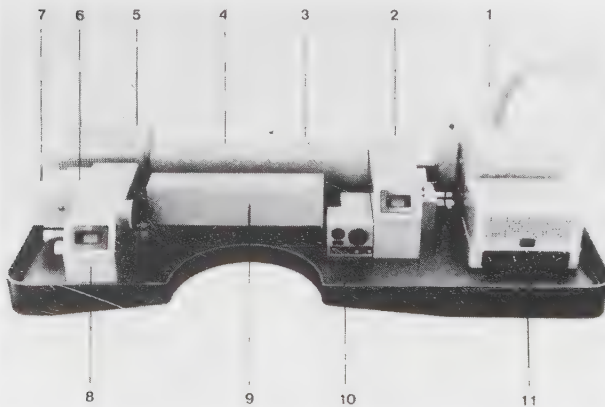


Abb. 2 Hautspektralfluorometer (Ansicht von oben)

Erklärungen zur Abbildung des Hautspektralfluorometers:

1 = Xenonlampe, 2 = Monochromator I, 3 = Ulenkoptik für den Primärstrahlengang, 4 = Steuermultiplier, 5 = Steuergerät für Eintrittsspalt von Monochromator I, 6 = Küvettenkasten für Photometrie, 7 = Meßmultiplier, 8 = Monochromator II, 9 = Ulenkoptik für Sekundärstrahlengang, 10 = Antrieb für automatische Prismendrehung von Monochromator I, 11 = Stromversorgungsgerät für Wasserstoff- und Wolframlampen.

Als Lichtquelle wurde eine Xenonlampe von 450 Watt verwendet. Die Strahlung wird durch zwei Monochromatoren geleitet, einen Anregungs- und einen Meßmonochromator. Beide sind zur Aufnahme von Spektren mit einem Antrieb zur automatischen Prismendrehung versehen. Die durch Lichtbogenschwankungen der Xenonlampe ungleichmäßige Anregungsenergie wird durch einen Photomultiplier, Typ 1 P 28, geregelt. Dadurch bleibt die Energie des Anregungslichtes im Wellenlängenbereich von 280 bis 400 nm nahezu gleich. Bei 470 nm weist der Multiplier seine maximale Empfindlichkeit auf, so daß der Spalt von der Spaltautomatik bei dieser Wellenlänge maximal eng gestellt wird.

Zur Fluoreszenzmessung soll sich das Meßobjekt genau im Schnittpunkt der Strahlengänge befinden. Um dies zu erreichen, wird auf die Hautoberfläche von oben her eine mit entsprechenden Gewichten belegte Spannvorrichtung angedrückt und mittels einer Druckfeder manuell oder automatisch in die richtige Höhe justiert. Das Fluoreszenzoptimum wird beim Justieren vom Digitalvoltmeter abgelesen.

Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt an einem XY-Schreiber. An der Y-Koordinate liegt die Signalspannung, an der X-Koordinate wird die Prismenstellung der Monochromatoren registriert.

B. Verschiedene Methoden der Meßtechnik

Die folgenden Angaben betreffen nur einen Teil der möglichen Anwendungen, nämlich die Messung an festen Oberflächen, bevorzugt die Spektren der Hautoberfläche.

1. Aufnahme von Remissionsspektren

Zur Remissionsmessung werden beide Monochromatoren auf den gleichen Anfangswert eingestellt. Die Spaltautomatik regelt Spalt 1, während Spalt 2 auf einen festen Wert eingestellt wird. Zunächst wird das Spektrum des Standards registriert, dann bei gleicher Verstärkung das Hautspektrum. Je nach dem Winkel erhält man verschiedene Spektren des auftreffenden Lichtes und der Anordnung der ableitenden Optik.

2. Zur Aufnahme von Excitationsspektren

ist grundsätzlich der Monochromator II auf einen festen Wert einzustellen, welcher der Fluoreszenzbande der zu messenden Substanz entspricht. Durch Verstellung von Monochromator I lassen sich die Absorptionsbanden einer Probe aufzeichnen, die zur Fluoreszenz bei der Durchlauffrequenz von Monochromator II beitragen.

3. Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren

wird Monochromator I auf eine bestimmte Wellenlänge eingestellt und Monochromator II in dem interessierenden Wellenlängenbereich automatisch verstellt. Die Anregung erfolgt dann mit einem Quantenfluß entsprechend der Spaltstellung und der jeweiligen Strahlungsintensität der Xenonlampe. Dabei wird das Fluoreszenzsignal gegen die jeweilige Prismenstellung von Monochromator II auf einem XY-Schreiber aufgezeichnet.

4. Zur Aufnahme von kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektren (KFES)

KFES stellen in einem Arbeitsgang Anregungs- und Fluoreszenzoptimum einer Substanz dar. Man muß sich dazu vorstellen, daß die Fluoreszenzeigenschaft einer Substanz in einem dreidimensionalen Spektrum mit den Koordinaten Fluoreszenz-Wellenlänge, Excitationswellenlänge und relativer Fluoreszenzintensität vollständig dargestellt werden kann. Hat das räumliche Gebilde, welches einer Hügellandschaft ähnlich sieht, mehrere Hügel, müssen mehrere Spektren und mehrere Schnitte gemessen werden, um die Substanzeigenschaft hinreichend zu beschreiben. Da die Haut und das Stratum granulosum in ihren Spektren immer nur zwei Gipfel aufweisen, sieht PRATZEL bei diesen Substanzen die Möglichkeit, KFES zu schreiben. Dabei durchläuft der Meßmonochromator den Fluoreszenzbereich zu der Zeit, in der sich der Anregungsmonochromator im Absorptionsbereich des Meßgutes befindet.

Obwohl es bei KFES nicht möglich ist, beide Gipfel exakt in ihrem Optimum zu erfassen, zogen wir diese Art der Spektren wegen der besseren Übersicht und der Arbeitsvereinfachung der einzelnen Aufzeichnung vor, zumal es bei den von mir durchgeführten Messungen hauptsächlich um die relative Fluoreszenzintensität der Substanzen geht.

III. METHODIK

A. Fluoreszenzmessung

1. Aufnahme eines kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektrums

Da die menschliche Haut in ihrem Spektrum immer nur zwei Gipfel aufweist und es bei meinen Messungen allein um die Änderung der Fluoreszenzintensität (FI) ging, war es möglich, alle fluorometrischen Prüfungen als KFES aufzuzeichnen.

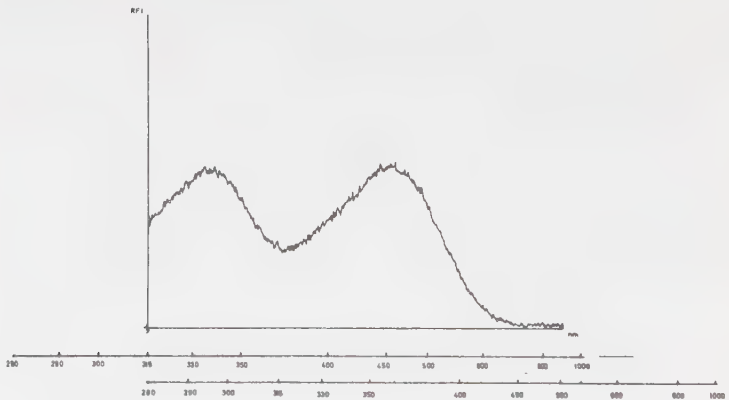


Abb. 3 Fluoreszenzspektrum der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut.

Oberer Maßstab: Stellung des Fluoreszenz-monochromators

Unterer Maßstab: Stellung des Anregungs-monochromators

Bei den Versuchspersonen handelte es sich durchwegs um Angestellte des Instituts. Die Messungen erfolgten stets an der Volarseite eines oder beider Unterarme der betreffenden Versuchsperson (VP). Nachdem die VP auf einer mehrfach verstellbaren Untersuchungs- liege in die erforderliche Lage gebracht, der Unterarm auf einer Armstütze fest fixiert worden war, wurden beide Monochromatoren, der Anregungsmonochromator M I von 280 nm und der Fluoreszenzmonochromator M II von 315 nm, zur gleichen Zeit gestartet.

Bei 295 bzw. 335 nm, dem Maximum des ersten Hautpeaks, erfolgte die Höhenjustierung der Armstütze mit festgeschnalltem Unterarm mittels eines mechanisch bedienbaren Spindeltriebs, bis das Digitalvoltmeter den höchstmöglichen Ausschlag anzeigte. Nach der nun erreichten optimalen Höhenjustierung wurden beide Monochromatoren in ihre Startstellung zurückgefahren. Beide Prismen konnten jetzt von ihrem Ausgangspunkt 280 bzw. 315 nm mit gewählter Geschwindigkeit den Wellenlängenbereich bis 500 nm (für den Anregungsmonochromator) und 900 nm (für den Fluoreszenzmonochromator) unter gleichzeitiger Aufzeichnung des Spektrums am XY-Schreiber durchlaufen.

2. Fluoreszenzmessungen zur Ermittlung der FI-Änderung vor und nach gesetztem Hautdefekt

Nach Aufzeichnung eines KFES von einem vorher gekennzeichneten intakten Hautareal einer VP (siehe unter A 1.) erfolgte die Setzung eines Hautdefektes an genau der gleichen vorher gemessenen Hautstelle. Diese Stelle wurde nach sorgfältiger Justierung so schnell wie möglich in den Strahlengang gebracht

und in beschriebener Weise wiederum aufgezeichnet. Durch mehrere Vorversuche ermittelten wir die günstigsten Zeitabstände für weitere Aufnahmen von KFES derselben Hautstelle.

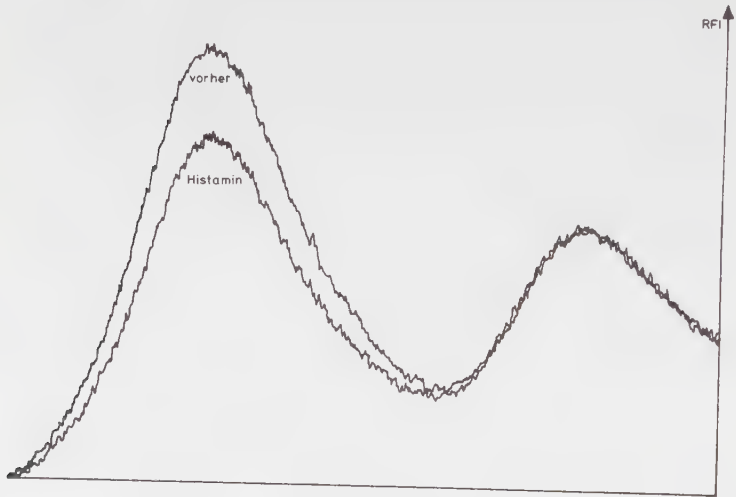


Abb. 4 Veränderung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut nach Histamineinwirkung

3. FI-Zeitmessungen über den fluorometrischen Verlauf eines gesetzten Hautdefekts

Da in dieser Versuchsreihe die FI des zweiten Hautpeaks interessierte, wurden beide Monochromatoren in die optimalste Differenzstellung gebracht (360 bzw. 450 nm) und arretiert. Die FI, zuerst von der unversehrten,

dann von derselben defekten Hautstelle, wurde auf einen Zeitschreiber mit einer Geschwindigkeit von 2 mm/min . übertragen. Der Unterarm der VP mußte während der Versuchsdauer bewegungslos im Strahlengang gehalten werden.

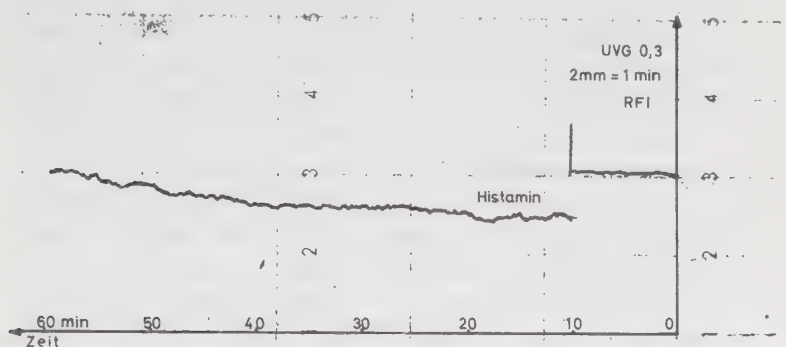


Abb. 5 Zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität bei 360 nm (Exc.) / 450 nm (Flu.) nach Histamineinwirkung

4. Standardmessungen

Jedem Versuch ging eine Standardmessung voraus. Dazu wurde ein fester Fluoreszeinstandard mit Halterung am Meßkopf angebracht und die maximale FI des ersten Peaks, dann des zweiten Peaks, am Digitalvoltmeter abgelesen. Gleiche FI-Anzeige bei zwischengeschobenen Standardmessungen garantierten damit auch fehlerlose Meßergebnisse von der intakten und veränderten Haut.

Vor jeder Versuchsmessung wurde weiterhin die Empfindlichkeit des Gerätes durch Messung eines Standards überprüft.

B. Histaminapplikation

1. Mit Iontophorese

Die Applikation von Histamin in die Haut erfolgte mit Hilfe der Iontophorese nach der Methode von ACKERMANN, die von MOSER weiter modifiziert wurde. Als Apparatur diente eine Gleichstromquelle mit einer indifferenten großflächigen Elektrode und einer differentiellen Elektrode von circa 1 x 1 cm. Letztere wurde auf ein gleich großes, gut mit Histaminlösung durchtränktes Filterpapier an der gewünschten Hautstelle aufgesetzt. Da sich Histamin kathodisch verhält, wurde es unter der Anode eingebracht. Die für die Histaminapplikation günstigste Dosis und die Einwirkzeit entnahmen wir den Angaben von JORNS: 15 Tropfen einer 1 % Histaminlösung, aufgefüllt auf 50 ml aqua destillata, 1 Minute Einwirkzeit; Stromstärke zwischen 0,02 und 0,06 mA. Die so veränderte Hautstelle wurde dann so schnell wie möglich in den Strahlengang gebracht.

2. Ohne Iontophorese

Die Histaminapplikation ohne Iontophorese verwendeten wir nur bei Fluoreszenzversuchen am Stratum granulosum. Sie erfolgte durch Benetzung des Stratum granulosums mit Histaminlösung in der Konzentration von 1 ppm und 0,2 ppm. Als Verdünnungsmittel diente dabei wiederum aqua destillata. Nach 1 Minute Einwirkzeit wurde der Rest der Histaminlösung mit Filterpapier abgesaugt und das so präparierte Stratum granulosum sofort in den Strahlengang gebracht.

C. Rutosidapplikation

1. In Form von Salben

Die Salbenapplikation erfolgte durch Bestreichen der gewünschten intakten oder durch Histamin veränderten Hautstelle. Wir verwendeten dazu eine 4 % Benzalkoniumsalbe und eine 2 % Venoruton P 4 Salbe. Nach einer Einwirkzeit von 1 Minute wurde der Rest der Salbe mit Filterpapier aufgesaugt und die so behandelte Hautstelle sofort gemessen.

2. In Form von Lösungen

Die Methodik gleicht hier der der Histaminapplikation ohne Iontophorese, beschrieben unter III B 2. Verwendung fand das Venoruton injektabile 4 % an der intakten oder durch Histamin veränderten Haut und dieselbe mit aqua destillata auf 1 ppm verdünnte Lösung am Stratum granulosum.

D. Entfernung des Stratum corneums

Das Stratum corneum, bestehend aus dem Stratum disjunctum und dem Stratum conjunctum, wurde bei vier Versuchspersonen an der Volarseite beider Unterarme auf eine Mindestfläche von 2 x 3 cm mittels Tesafilmstreifen entfernt. Diese Abrißtechnik mit Klebefilmstreifen stammt von WOLF und wurde von SZAKALL weiterentwickelt. Da das zu entfernende Stratum conjunctum, Barrierehäutchen genannt, aus fest ineinander verhafteten Hornzellen besteht, erhielt jede VP 24 Stunden vor Versuchsbeginn ein Pflaster auf die betreffenden Hautstellen. Durch Vorversuche mit und ohne Pflastermethode konnte geklärt werden, daß die unter dem Pflaster vermehrt entstehende Feuchtigkeit die Kohärenz des Stratum conjunctum lockert und somit die bei den Hornhautabrissen verursachte Rei-

zung des darunterliegenden Coriums so gering wie möglich gehalten wird. Zur Gewinnung des Stratum granulosums benötigten wir circa 10 - 15 Abrisse. Jede Manipulation an den Hautabrißstellen, z. B. mit Wasser oder Seife, mußte von den VP während der Versuchsdauer (eine letzte fluorometrische Aufzeichnung erfolgte nach 22 Stunden) vermieden werden.

E. Auswertung der Versuchsergebnisse

Bei der Auswertung der Meßergebnisse war allein die relative Fluoreszenzintensität (RFI) -Differenz zwischen unveränderter und der durch Histamin veränderten Hautstelle von Interesse. Die vom XY-Schreiber notierte RFI beider Peaks des Hautnormalspektrums in mm gemessen, wurde mit jeweils 100 % bewertet. Jede FI-Änderung bei weiteren Messungen an der veränderten Hautstelle konnte nun, bezogen auf die RFI, von der intakten Hautstelle (= 100 %) für jeden Hautpeak berechnet werden.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE

A. Fluoreszenzänderungen an der Hautoberfläche durch Histaminapplikation

Bei VP 1 zeigte nach Histaminapplikation in bekannter Weise - die Stromstärke betrug 0,02 mA - die Hautstelle eine stark ausgeprägte Hyperämie mit Bildung winziger Bläschen und Juckreiz. Nach 40 Minuten waren die Bläschen und der Juckreiz verschwunden, die Rötung kaum noch wahrzunehmen. Nach 90 Minuten unterschied sich das behandelte Hautareal nicht mehr von seiner Umgebung.

Die FI-Veränderungen beider Hautpeaks, bezogen auf die RFI der intakten Hautstelle, nach 5, 40 und 90 Minuten zeigt folgende Graphik:

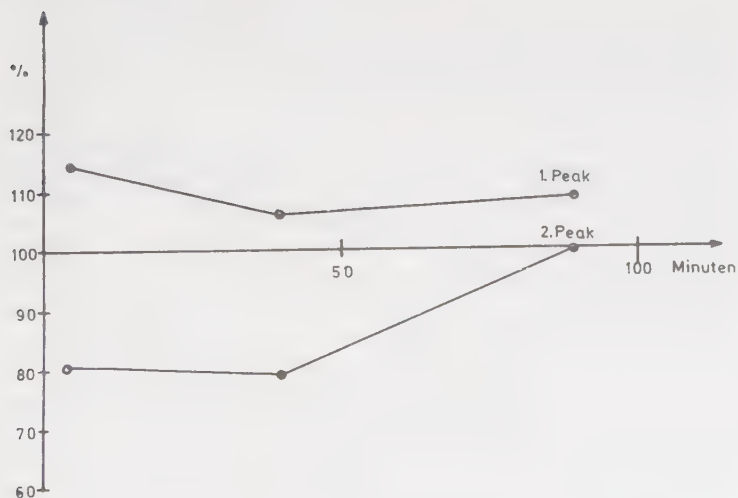


Abb. 6 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut nach Histaminapplikation bei 295 nm (Exc) / 335 nm (Flu) und 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) (VP 1)

Die zweite VP zeigte nach Histamineinwirkung eine wesentlich stärkere Hautreaktion als VP 1. Neben intensiver Hyperämie mit fleckiger Rötung der näheren Umgebung, Niveauerhöhung und Bläschenbildung durch erfolgte Exsudation, bestand starker Juckreiz, der sich zu einem Brenngefühl steigerte. Erst nach zwei Stunden hatte sich das Hautareal seiner Umgebung wieder vollkommen angeglichen. Fluoreszenzmessungen von der betreffenden Hautstelle wurden nach 5, 20, 40, 70 und 120 Minuten durchgeführt und zum besseren Verständnis durch eine Graphik erläutert.

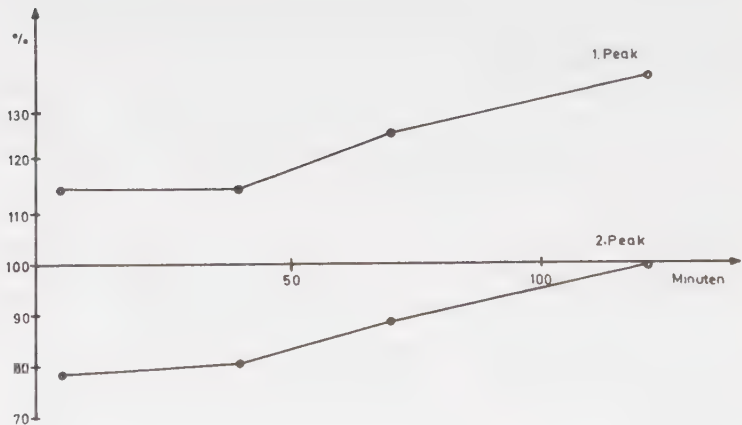


Abb. 7 wie bei Abb. 6 (VP 2)

Die dritte VP unterlag denselben Versuchsbedingungen wie bei VP 1 beschrieben. Die Hauterscheinungen nach Histamineinwirkung waren hier am schwächsten ausgeprägt. Der gesetzte Hautdefekt erschien, oberflächlich betrachtet, nach 70 Minuten völlig normalisiert.

Messungen erfolgten nach 5 und 70 Minuten.

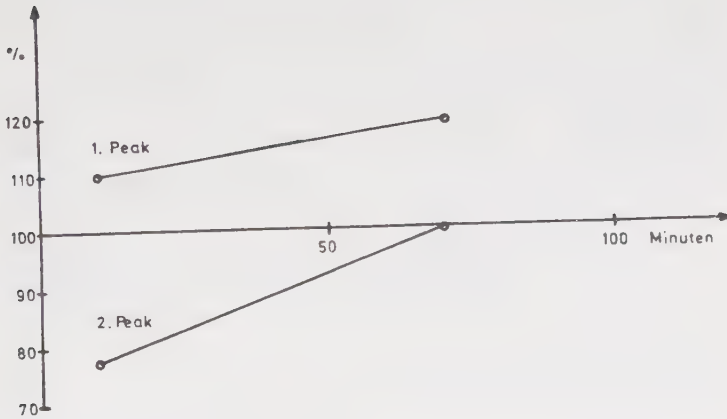


Abb. 8 wie bei Abb. 6 (VP 3)

B. Fluoreszenzmessungen über den zeitlichen Verlauf der durch Histaminapplikation gesetzten Hautverletzung ad restitutionem cutis

Bei der FI-Messung über den Zeitverlauf von der Setzung eines Hautdefektes waren im folgenden Versuch nur die FI-Änderungen des langwelligen Gipfels von Interesse, da die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe übereinstimmend zeigten, daß nur die FI-Änderungen dieses Hautpeaks mit der Größe des Hautdefektes und seiner Heilung in Beziehung stehen, und bei Normalisierung der Hautverletzung wieder die FI des identischen intakten Hautareals erreicht wird. (Abb. 5, Seite 17)

C. Der Einfluß von Rutosiden auf die durch Histamin veränderte Hautfluoreszenz

1. Qualitative und quantitative Prüfung des Hautspektrums nach Applikation von 4 % Venoruton mit der Trägersubstanz Nipasol:

Die Hautstelle zeigte nach Wirkstoffapplikation während der Versuchsdauer keine sichtbare Reaktion. Messungen wurden nach 5, 40, 70 und 100 Minuten gestartet.

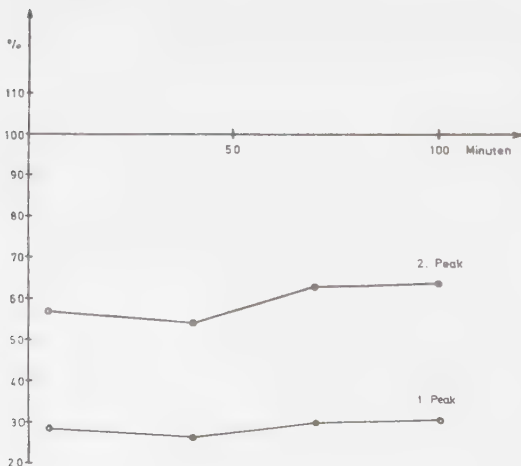


Abb. 9
Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut bei 295 nm (Exc)/335 nm (Flu) und 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) nach Einwirkung von Venoruton 4 %

Obwohl kein Qualitätsunterschied zum normalen Hautspektrum auftrat, war die enorme FI-Abnahme bei beiden Hautpeaks auffallend, die über die gesamte Versuchsdauer kaum eine Änderung erfuhr.

2. Prüfung des Hautspektrums nach Nipasolapplikation:

Um zu klären, ob der eigentliche Wirkstoff oder die Trägersubstanz die FI-Minderung beider Gipfel verursacht, wurden nach Nipasolgabe Spektren in Abständen von 5 und 100 Minuten angefertigt. Die Messung nach 100 Minuten zeigt, daß der Wirkstoff allein für die quantitative Veränderung des Hautspektrums verantwortlich ist.

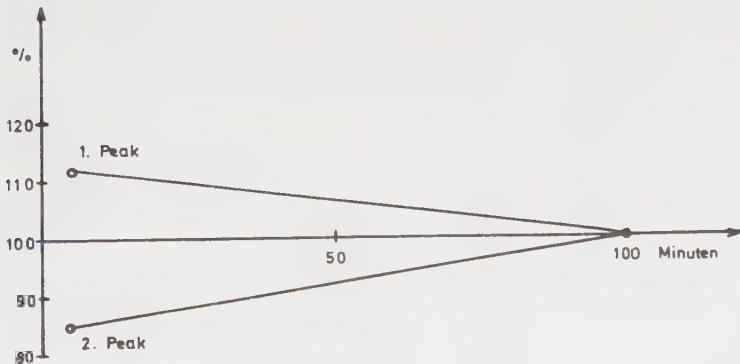


Abb. 10 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut bei 295 nm (Exc)/335 nm (Flu) und 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) nach Einwirkung einer Placebosalbe mit Nipasol

3. Rutosidapplikation auf die durch Histamin veränderte Haut:

Die Haut reagierte in bekannter Weise auf Histamin, erfuhr durch Gabe von einer Venorutonsalbe 4 % und Benzalkonium keine Veränderung der Hauteffloreszenzen. Messungen nach 5, 40, 70 und 100 Minuten zeigten wiederum eine hohe FI-Einbuße bei beiden Gipfeln.

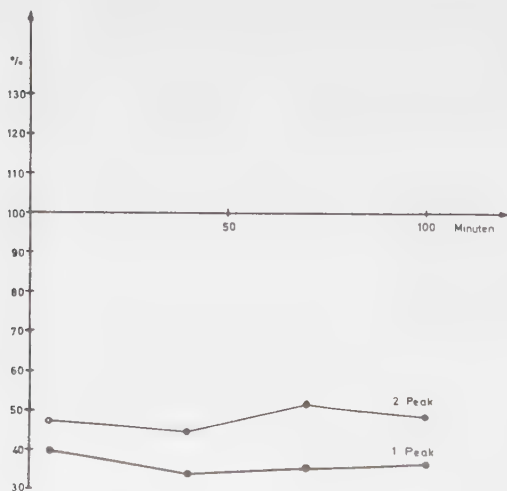


Abb. 11 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz der menschlichen Haut bei 295 nm (Exc)/335 nm (Flu) und 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) nach Einwirkung einer 4 %igen Venorutonsalbe mit Benzalkonium.

Weitere Versuche mit Verwendung von 2 %iger Venoruton- P^4 -Salbe und 4 %iger Venorutonlösung erbrachten eine entsprechende FI-Abnahme bei beiden Peaks.

4. Rutosidapplikation in Form von Venoruton injectabile 1 : 100 am Stratum granulosum:

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß der FI-Verlust nach Rutosidgabe durch Veränderung des oberflächlichen Hautgewebes hervorgerufen wird, starteten wir Messungen am Stratum granulosum einer VP.

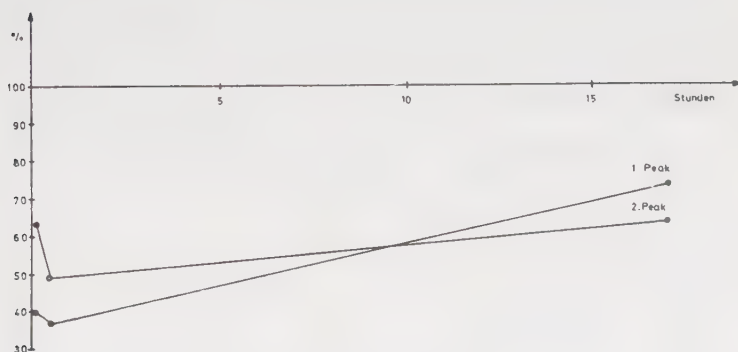


Abb. 12 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz des menschlichen Stratum granulosums bei 295 nm (Exc)/335 nm (Flu) und 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) nach Einwirkung von Venoruton injectabile 1 : 100

Wie die Graphik zeigt, kommt es auch am Stratum granulosum zu einer FI-Abnahme bei beiden Peaks. Selbst eine Messung nach 17 Stunden erbrachte noch eine FI-Abnahme von 26,7 % beim ersten Gipfel, 37 % beim zweiten Gipfel.

D. Fluoreszenzänderungen am Stratum granulosum nach Applikation von Histamin und Wasser

In dieser Versuchsreihe interessierten uns die Qualität und Quantität beider Gipfel des unveränderten Stratum granulosums und des durch Wasser und Histamin in verschiedenen Konzentrationen veränderten Stratum granulosums von vier VP. Das Stratum granulosum zeigte bei allen VP nach den Hornhautabrissen die klassischen Symptome einer lokalen Entzündung: Rubor, tumor (Hyperämie + Exsudat), calor und dolor. Bei der Verwendung von Histaminlösung 1 ppm verspürten alle VP leichten Juckreiz ohne Verstärkung der bestehenden Hyperämie. Bei der letzten Messung nach 22 Stunden war bei allen VP eine sichtbare Schorfbildung nachweisbar.

1. FI-Veränderungen hinsichtlich des ersten Gipfels:

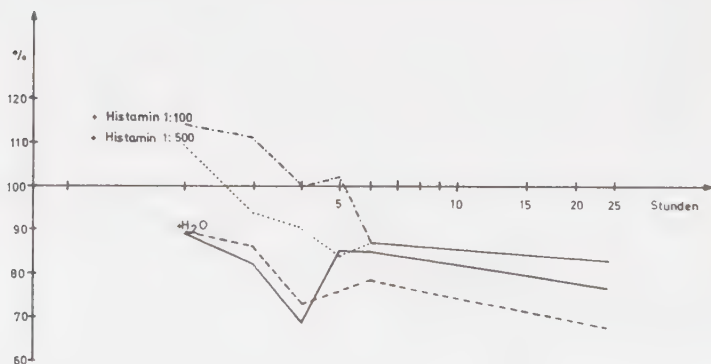


Abb. 13 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz des menschlichen Stratum granulosums bei 295 nm (Exc)/335 nm (Flu) (ausgezogene Kurve) und nach Einwirkung verschiedener Histaminkonzentrationen und Wasser (VP 1)

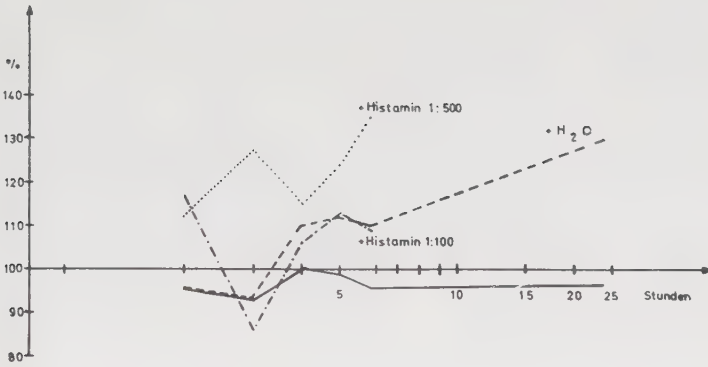


Abb. 14 wie bei Abb. 13 (VP 2)

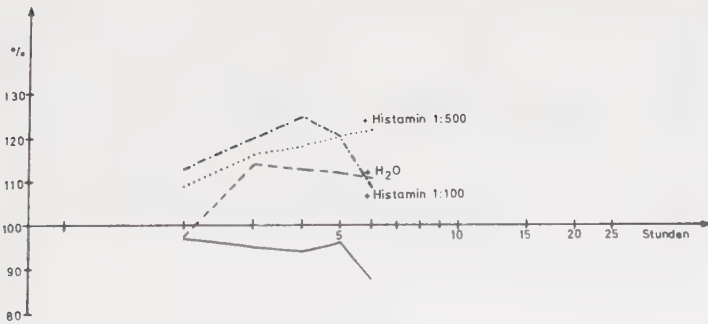


Abb. 15 wie bei Abb. 13 (VP 3)

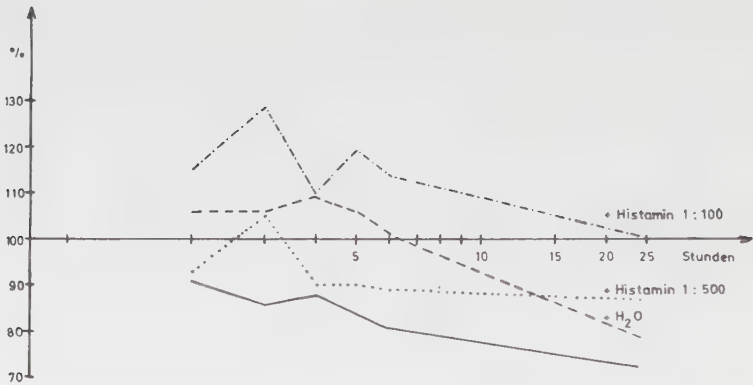


Abb. 16 wie bei Abb. 13 (VP 4)

2. FI-Veränderungen hinsichtlich des zweiten Gipfels:

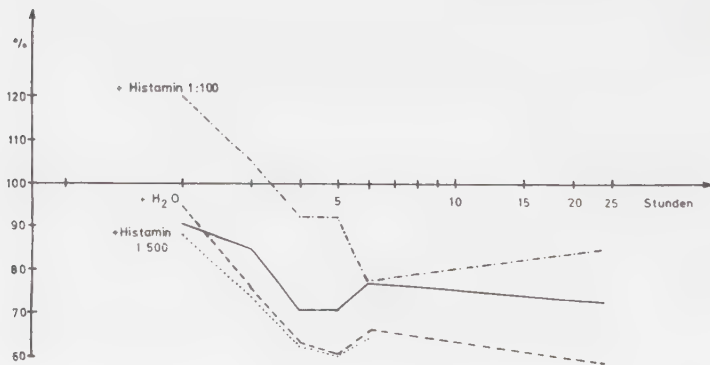


Abb. 17 Zeitliche Veränderung der prozentualen Änderung der Eigenfluoreszenz des menschlichen Stratum granulosums bei 360 nm (Exc)/450 nm (Flu) (ausgezogene Kurve) und nach Einwirkung verschiedener Histaminkonzentrationen und Wasser (VP 1)

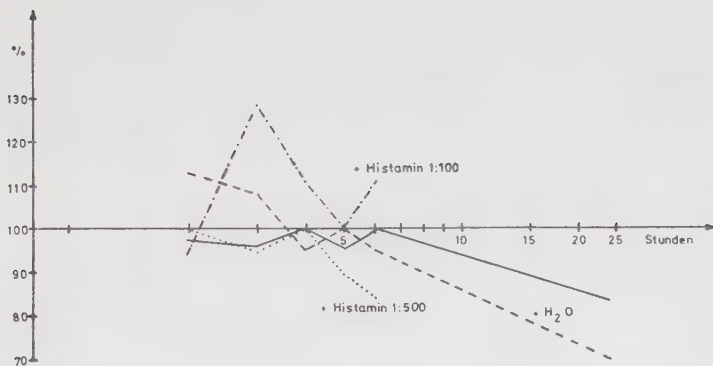


Abb. 18 wie Abb. 17 (VP 2)

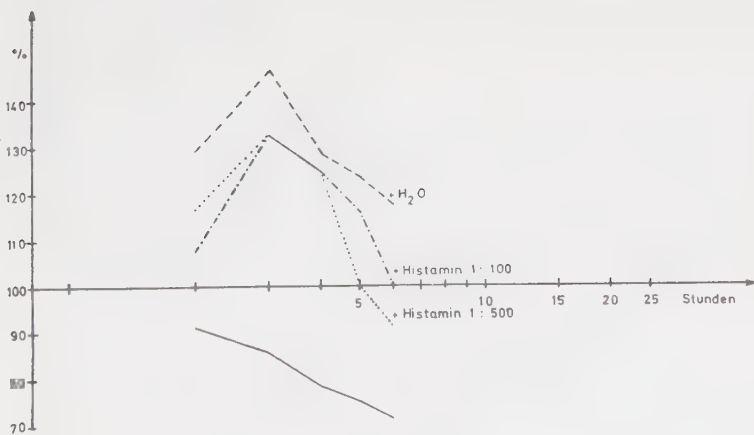


Abb. 19 wie bei Abb. 17 (VP 3)

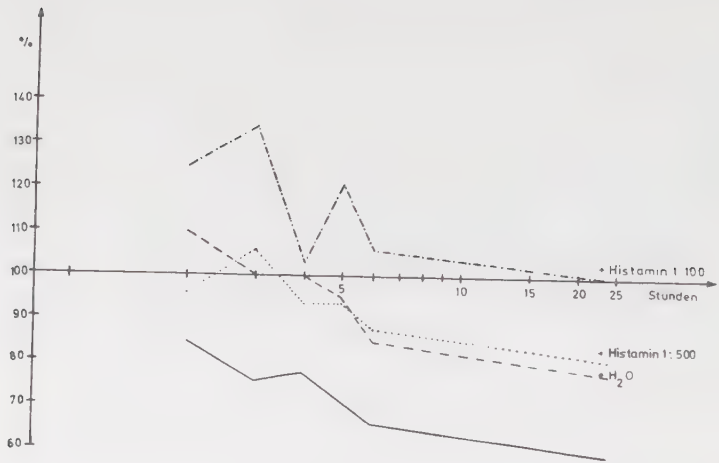


Abb. 20 wie bei Abb. 17 (VP 4)

V. DISKUSSION

Die Hautreaktionen nach Einbringung ein- und derselben Histamindosis waren bei allen VP unterschiedlich ausgeprägt. Sie erstreckten sich von einer einfachen Hyperämie bis zu einer starken Rötung mit Niveauerhebung, Bläschenbildung und fleckiger Rötung der näheren Umgebung der behandelten Hautstelle. Die Rückbildung der Hauterscheinungen und des Juckreizes erfolgte bei den einzelnen VP bei gleicher Histamindosis zeitlich ebenso verschieden (von 70 Minuten bis 2 Stunden). Diese individuell unterschiedlichen Hautreaktionen auf einen Histaminreiz hinsichtlich Intensität und Dauer lassen sich so erklären, daß die iontophoretisch in die Haut eingebrachte Wirkstoffmenge von dem elektrischen Leitvermögen der Epidermis, d. h. von der Anzahl der Talg- und Schweißdrüsen und dem Wassergehalt abhängt (KOWAR-SCHICK). Auch fluorometrisch konnte diese individuell verschiedenartige reaktive Potenz auf einen Histaminreiz nachgewiesen werden.

Erster Peak

Bevor ich auf eine Diskussion meiner Ergebnisse hinsichtlich des ersten Hautpeaks eingehe, sollen kurz die bisher bekannten Faktoren für das Zustandekommen dieses Peaks erläutert werden.

Im Bereich des ersten Gipfels wird den Aminosäuren im Stratum corneum ein hoher Absorptionsgrad der anregenden Strahlung zugesprochen. Diese absorbierte Energie muß jedoch nicht als Fluoreszenzstrahlung emittiert werden, sondern kann auch in irgendeine andere Energieform, z. B. in Wärme, umgewandelt werden. Damit steht natürlich für in diesem Wellenbereich fluores-

zierende Substanzen weniger Anregungsenergie zur Verfügung. Zu den Verbindungen in der Hornhaut, die UV-Licht absorbieren, doch diese Energie nicht zur Fluoreszenzstrahlung verwenden, zählen die freien, nicht aromatischen wasserlöslichen Aminosäuren und die Urocaninsäure. Man führt ihre fluoreszenzlöschende Wirkung auf einen inneren Filtereffekt, den sogenannten Quenchingeffect, zurück. Als fluoreszierende Substanzen sind aromatische Aminosäuren, Inhaltsstoffe des Keratingerüstes der Hornhaut, anzunehmen. Nach UDEN-FRIEDS Angaben liegt das Fluoreszenzmaximum von gebundenem Tryptophan bei 335 bis 340 nm bei einer Anregung von 290 bis 295 nm. Tyrosin könnte an der kurzwelligen Schulter des ersten Peaks maßgeblich beteiligt sein, da sein Anregungsoptimum bei 280 nm liegt (Start unserer KFS bei 280 nm). Nach RATTENHOFER bestehen die Hautkeratine aus beachtlichen Mengen Tyrosin und Tryptophan.

Nach Histaminapplikation kam es in meiner ersten Versuchsreihe bei allen VP hinsichtlich des ersten Hautpeaks zu einer deutlichen RFI-Zunahme. Da der Histaminreiz sich nicht auf die Hornhaut, sondern allein auf die periphere Endstrombahn, die Arteriolen, auswirkt, muß die RFI-Zunahme auf das bei der Histaminlösung verwendete Wasser zurückgeführt werden. In der Dissertation von HOLZER wurden durch Wasserelution der isolierten Hornhaut alle wasserlöslichen Substanzen vollständig entfernt. Die Folge war ein RFI-Zuwachs von 160 bis 343 % im Bereich des kurzwelligen Gipfels. In meinen Versuchen führte die Einbringung der Histaminlösung, die aus fünfzehn Tropfen einer einprozentigen Histaminlösung, aufgefüllt auf 50 ml Wasser, bestand, zu einer Teilelution der wasserlöslichen Stoffe, wie der nicht-aromatischen Aminosäuren

und der Urocaninsäure, die fluoreszenzlöschend wirken können (PRATZEL). Für diese Annahme spricht auch, daß die RFI-Zunahme trotz Abklingen der Hauterscheinungen bestehen blieb. Ob die durch den Histaminreiz aus den Kapillaren durch Zusammenziehen ihrer Endothelien erfolgte proteinhaltige Exsudation mit einer Rolle auf die FI spielt, ist ungeklärt.

Zweiter Peak

Im Bereich des zweiten Hauptpeaks, der bei anregender Strahlung von ca. 350 nm sein Fluoreszenzmaximum zeigt, ist bekannt, daß vom Anregungslicht in diesem Wellenbereich die Substanzen der Hornhaut nur etwa 20 % absorbieren (HOLZER). Somit müßten die restlichen 80 % von darunterliegenden Hautschichten, z. B. dem Corium, das über ein oberflächliches Gefäßnetz gut mit Blut versorgt wird, oder der Subcutis, absorbiert werden. Durch den Histaminreiz kommt es in der terminalen Blutstrombahn zu einer Erhöhung der Hautdurchblutungsgröße und zu einer Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks des Epidermisgewebes.

Bekannterweise wird durch das erhöhte Sauerstoffangebot das reduzierte Pyridinnucleotid NADH in die Oxidationsstufe NAD^+ übergeführt. Bekannt ist, daß NADH bei 340 nm Excitation sein Fluoreszenzmaximum bei 460 nm erreicht (UDENFRIED). Meine Versuchsergebnisse hinsichtlich des zweiten Gipfels bestätigen, daß der Sauerstoffpartialdruck, d. h., daß das jeweilige Angebot an Sauerstoff in einem nahen Zusammenhang mit der Fluoreszenzintensität des zweiten Hauptpeaks steht. Bei allen VP trat nach Histaminapplikation ein RFI-Verlust ein, der in den weiteren Zeitmessungen sich der FI der Hautnormalkurve wieder näherte. Eine letzte

Messung nach Normalisierung des Hautdefektes, der, wie schon erwähnt, bei allen VP in Dauer und Intensität stark differierte, war mit der FI der Hautnormalkurve identisch.

Damit eröffnete sich durch zeitliche Beobachtung des zweiten Hautpeaks eine Möglichkeit, fluorometrisch einen gesetzten Hautdefekt bis zu seiner Heilung übersichtlich mitzuverfolgen. Eine fluorometrische Aufzeichnung über den gesamten Verlauf der Rückbildung des gesetzten Hautdefektes zeigt, daß dieser nicht in einzelnen Phasen, sondern kontinuierlich vonstatten geht (zwischen 70 und 120 Minuten). Die Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes in der terminalen Blutstrombahn, ausgelöst durch einen Histaminreiz, wird durch Konkurrenzreaktionen, wie vermehrte Ausschüttung von Antihistaminika, bis zur Normalisierung gleichmäßig gebremst. Die optische Nachweismethode setzt voraus, daß die Reduktion des Pyridinsystems zum Dihydropyridinsystem und die Umkehrung dieser Reaktion in enger Verbindung steht zur jeweiligen Hautdurchblutungsgröße und dem damit verbundenen Sauerstoffangebot.

Die Möglichkeit der fluorometrischen Mitverfolgung dieser biochemischen Reaktionsgleichung gab den Anlaß, eine Art Arzneimittelprüfung durchzuführen. Es sollte mit dieser Fluoreszenzmethode ermittelt werden, ob mit antiexsudativen, antiphlogistischen und damit antiallergischen Substanzen sich die Regeneration eines durch Histamin gesetzten Hautdefektes verkürzen läßt.

Nach einer Vielzahl von zeitlich aufwendigen Versuchen mit Verwendung von Rutosiden auf der Haut und auf dem Stratum granulosum erfuhren beide Hautgipfel immer

hohe RFI-Abnahmen. Trotz Gebrauch von verschiedenen Rutosidkonzentrationen in Salben- und Lösungsform blieb die RFI-Abnahme weiterhin bestehen. Versuche mit dem Trägerstoff allein, dem Nipasol, erbrachten keine Veränderung der FI. Somit mußte der Grund für die Fluoreszenzabnahme nach Auftragen von Rutosiden auf die Haut beim Wirkstoff selbst liegen. Die Erklärung für die hohe FI-Abnahme fand sich in einer später von der Firma ZYMA veröffentlichten Arbeit über die von uns verwendeten Hydroxy-aethyl-rutoside, die bei 254 und 350 nm absorbieren.

Trotz dieses Mißerfolges könnte unsere Meßmethode unter Verwendung anderer Wirkstoffsubstanzen mit günstigeren Absorptionskurven durchaus erfolgreich sein und damit einen fluorometrischen Nachweis über den Grad der Wirksamkeit eines Arzneimittels darstellen.

Erster Peak.

Hinsichtlich des kurzwelligen Gipfels in der dritten Versuchsreihe schien es mir zweckmäßiger, die vier verschiedenen Versuche, an denen vier VP teilnahmen, einzeln durchzusprechen.

Nach Entfernung der Hornhaut bis zum Stratum granulosum kam es bei der ersten Messung zu einer circa 100% RFI-Zunahme, bezogen auf die FI der vorher aufgenommenen Hautnormalkurve.

Das Stratum granulosum zeigt im Elektronenmikroskop neben Zellen mit Kernen gekörnte Filamente, die bei der menschlichen Haut im Durchschnitt 1 - 5 μ betragen. Sie werden Keratohyalin genannt. Über ihre interne Struktur ist bisher wenig bekannt geworden (MONTAGNA, LOBITZ und BRODY). Nach neuesten autoradiographi-

schen Befunden sind Serin, Glycin sowie Histidin und Arginin bevorzugte Baustoffe der Skleroproteine, die im Stratum granulosum zum Keratohyalin, der Vorstufe des Keratins, synthetisiert werden. Von Bedeutung für die Diskussion meiner Versuche am Stratum granulosum scheint mir die Entstehung der Urocaninsäure und ihr hauptsächlichliches Vorkommen in der menschlichen Haut zu sein. Es wird angenommen, daß die Urocaninsäure aus dem keratohyalinständigen Histidin gebildet wird und fast ausschließlich im Stratum corneum vorliegt (SCHWARZ). Die Urocaninsäure absorbiert bei 265 nm. Auch die Lipide spielen wie die Urocaninsäure bei der FI-Änderung nach Ablösung des Stratum corneums eine große Rolle. HERMANN und Mitarbeiter weisen der pars conjuncta den größten Lipidgehalt zu, nämlich zwei- bis dreiviertel der Hornschicht. Diese beiden Substanzen scheinen die maßgeblichen Faktoren für die hohe RFI-Zunahme am unveränderten Stratum granulosum zu sein. Sie absorbieren zwar stark im Bereich des ersten Gipfels, wirken bekannterweise jedoch fluoreszenzlöschend. Durch die Hornhautabrisse wurde der größte Teil dieser beiden Fluoreszenzlöcher mit entfernt. Dadurch scheinen die Proteine, der Typ A mit Tryptophan und der Typ B mit Tyrosin, durch ein vergrößertes Angebot von Anregungslicht größere Fluoreszenzeigenschaften im bekannten Wellenbereich zu erhalten (RATTENHOFER).

Alle weiteren Messungen am unveränderten Stratum granulosum, die letzte nach 22 Stunden, erbrachten einen RFI-Rückgang von 20 - 30 % je nach VP, wobei die höchste RFI-Minderungsrate bei allen VP in der Messung nach einer Stunde erreicht wurde. Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, daß nach Hornhautabrissen mit Klebestreifen die Mitosequote der Hornzellen auf das

zwanzigfache der ursprünglichen Norm ansteigt (PINKUS). Die Regenerationsdauer der Hornzellen soll sich dabei nach der Stärke des gesetzten Reizes richten. Nach SZAKALL erfolgt der Nachschub der wasserlöslichen Substanzen vom Stratum granulosum her. Auch bei diesem Vorgang ist es durchaus denkbar, daß sich die Produktionsmenge von wasserlöslichen und somit fluoreszenzlöschenden Stoffen proportional zum jeweiligen Reizzustand des Stratum granulosums verhält und somit die bei der Messung nach einer Stunde erreichte RFI-Abnahme erklärt werden kann.

Die Ergebnisse der Messungen am Stratum granulosum unter Einwirkung von Wasser unterschieden sich kaum von denen des unveränderten Stratum granulosums. Die geringe RFI-Zunahme bei drei VP könnte seine Erklärung darin finden, daß der größte Teil der wasserlöslichen Inhaltsstoffe bereits durch die Hornhautabrisse entfernt wurde und eine weitere Teilelution durch Wassereinbringung zu dieser geringen Fluoreszenzzunahme beitrug. Die quantitativ verschiedene, aber bei allen VP registrierte FI-Abnahme bei der letzten Messung nach 22 Stunden, läßt auch hier auf die schnelle Bildung eines neuen Barrierehäutchens schließen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse nach Einbringung von Histaminlösung 0,2 ppm zeigt in den jeweiligen Zeitmessungen jeder VP einen fast identischen Verlauf, bezogen auf den Versuch mit Wasser, und läßt deshalb die Vermutung zu, daß die FI-Veränderungen fast allein auf das hierbei verwendete Wasser zurückzuführen sind.

Die Verwendung von Histaminlösung von 1 ppm erbrachte dagegen bei drei VP eine deutliche RFI-Zunahme beim

kurzwelligen Gipfel, der nach vier Stunden noch über der FI des unveränderten Stratum granulosum lag. Ob es durch die höhere Histaminkonzentration zur Aufhebung von weiteren Quenchingvorgängen kam, wie etwa durch Verlagerung von Substanzpools, die für die Lichtausbeute in diesem Wellenbereich verantwortlich sind, konnte in meinen Versuchen nicht geklärt werden. Ein möglicher Zusatzfaktor für die RFI-Zunahme stellt die nach Benetzung mit Wasser entstehende Verdunstungskälte dar, zumal sie sich in diesen Versuchen wegen fehlenden Barrierehäutchens direkter auf das terminale Gefäßsystem auswirken konnte. GALLY und EDELMANN untersuchten die Fluoreszenz von Tryptophan und Tyrosin im Bereich von 25 - 95° C und stellten fest, daß die FI mit steigenden Temperaturen erheblich geringer wird und umgekehrt. ATZINGER erreichte durch Verwenden von Eiswasser eine RFI-Steigerung bei beiden Hautpeaks.

Zweiter Peak

Die FI des zweiten Gipfels vom unveränderten Stratum granulosum lag, wie ATZINGER schon feststellte, beträchtlich unter dem FI der Hautnormalkurve. Hier interessieren nur die FI-Veränderungen am Stratum granulosum nach Messungen, die in den bekannten Zeitabständen aufgenommen wurden.

Wegen der geringen FI bei diesem Peak bereitete die Darstellung der FI-Verschiebungen nach den einzelnen Zeitmessungen Schwierigkeiten, zumal bei dieser Versuchsreihe die Leistung der für das Anregungslicht verantwortlichen Xenonlampe stetig nachließ, was eine weitere Abschwächung der FI bedeutete.

Trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen erbrachten die Zeitaufnahmen am unveränderten Stratum granulosum

bei allen vier VP eine mehr oder weniger fallende Tendenz der RFI, die nach 22 Stunden, der letzten Messung, 20 - 40 % betrug.

Wie schon erwähnt, führen die Hornhautabrisse durch die mechanische Reizung des Coriums und der Subcutis zu einer lokalen Erhöhung der Durchblutungsgröße und damit zu einer Vermehrung des O_2 -Angebotes. Durch das Ansteigen des Sauerstoffpartialdruckes wird über die Atmungskette vermehrt reduziertes Pyridinnukleotid (NADH) in die Oxydationsstufe (NAD^+) übergeführt. Da bekanntlich NADH in diesem Wellenbereich das Anregungslicht absorbiert, kommt es folglich zu einer Senkung der FI. Die FI-Abnahme steht in einem bestimmten Verhältnis zum jeweiligen Sauerstoffangebot. Meine Ergebnisse vom unveränderten Stratum granulosum lassen den Schluß zu, daß die Entfernung des Stratum corneums zusätzlich zu einer endogenen Histaminfreisetzung führte. Die dadurch ausgelöste Vasodilatation in Arteriolen und Kapillaren erfolgt langsam ansteigend und war bei der letzten Messung nach 22 Stunden noch nicht abgeschlossen. In diesem Fall wäre es von Interesse gewesen, durch Messungen über einen noch längeren Zeitraum den Gipfel der Vasodilatation und ihren abfallenden Schenkel fluorometrisch darstellen zu können.

Durch Einwirkung von Wasser auf das Stratum granulosum entsteht Verdunstungskälte, die durch Fehlen des Barrierehäutchens verstärkt zu einer Gefäßreaktion führt. Diese Vasokonstriktion steht anfangs der histaminbedingten Vasodilatation entgegen. Meine Versuchsergebnisse zeigen diese Konkurrenzreaktionen in einem RFI-Gewinn in der Messung nach Wasserapplikation. Die weiteren fluorometrischen Aufnahmen verzeichnen eine konstante RFI-Abnahme als Zeichen der stetig zunehmenden Vasodilatation.

Fast identisch zum Versuch unter Verwendung von Wasser waren die RFI-Schwankungen nach der Benetzung des Stratum granulosum mit Histaminlösung 0,2 ppm. Nur die RFI-Zunahme in der ersten Messung nach Histaminapplikation war bei zwei VP schwächer, bei zwei VP gar nicht zu verzeichnen. Das heißt: Das im vorigen Versuch anfänglich bestehende Übergewicht der Gefäßreaktion, ausgelöst durch den Verdunstungseffekt, wird durch verstärkte Konkurrenzreaktion (endogene Histaminfreisetzung und exogenes Histamin) mehr oder weniger ausgeglichen.

Völlig unerwartete Ergebnisse brachte der letzte Versuch am Stratum granulosum nach Einbringung von Histaminlösung 1 ppm. Statt einer erhofften RFI-Abnahme durch vermehrtes Histaminangebot trat bei allen VP eine RFI-Zunahme ein, die bei drei von vier VP bis zur letzten Messung anhielt.

Eine Erklärung könnte darin liegen, daß die Arteriolen, die die Blutverteilung in den Kapillaren mitregeln, durch den Histaminreiz stark vasodilatiert, den kolloid-osmotischen Druck in den Kapillaren derart erhöhen (über 30 mmHg), daß es zu einem Blut- und Flüssigkeitsaustritt in das benachbarte Gewebe kommt. Dieses stark protein- und lipidhaltige Exsudat müßte demnach bis zu seiner Rückresorption in die Blutbahn das RFI-Verhalten im Sinne einer lang anhaltenden Steigerung beeinflussen haben.

Wegen fehlenden Barrierehäutchens könnte dieser Histaminreiz natürlich auch einen lokalen Gefäßkollaps mit Blutstasis in den betroffenen Arteriolen und Kapillaren ausgelöst haben, wodurch es wegen absinkenden Sauerstoffpartialdruckes zu diesem RFI-Zuwachs führen würde.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In vielen von ATZINGER durchgeführten Voruntersuchungen, die hauptsächlich der Erfassung der Gerätedaten dienten, z. B. der Empfindlichkeit und den Korrekturmöglichkeiten, konnte bewiesen werden, daß mit dem von PRATZEL entwickelten Hautspektralfluorometer das Fluoreszenzverhalten der lebenden menschlichen Haut untersucht werden kann.

Da in meiner Arbeit vor allem die Änderung der Fluoreszenzintensität interessierte, die nach Histaminapplikation in die Haut auftrat, war es möglich, statt der Aufzeichnung reiner Fluoreszenz- und Excitationsspektren die für Vergleiche übersichtlicheren kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektren zu wählen. Die Messungen erfolgten an der Volarseite des Unterarmes einer Versuchsperson und wiesen ausnahmslos zwei Fluoreszenzpeaks auf, wobei das Maximum des ersten Peaks bei 295 nm (Exc.) bzw. 335 nm (Flu.), das des zweiten Hautpeaks bei 360 nm (Exc.) bzw. 460 (Flu.) lag. In jeder Versuchsreihe wurden zuerst von der intakten und danach von der veränderten Hautstelle Fluoreszenzspektren in gewissen Zeitabständen aufgenommen.

Hinsichtlich des ersten Peaks von der Hautoberfläche kam es nach Histamineinwirkung bei allen Versuchspersonen zu einer bleibenden Fluoreszenzzunahme, bezogen auf die Fluoreszenzintensität der Hautnormalkurve. Da in diesem Wellenbereich ein Teil des Anregungslichtes von wasserlöslichen Inhaltsstoffen der Hornhaut absorbiert wird, liegt der Schluß nahe, daß die Fluoreszenzzunahme durch Entfernung wasserlöslicher Verbindungen durch das bei der Histaminlösung verwendete

Wasser hervorgerufen wurde. Durch Teilelution fluoreszenzlöschender Substanzen der Hornhaut stand den bekannten fluoreszierenden Substanzen damit mehr Anregungslicht zur Verfügung.

Die Ergebnisse der fluorometrischen Aufnahmen vom zweiten Hautpeak in verschiedenen Zeitabständen erhärteten unsere bisherige Auffassung, daß die Fluoreszenzintensität in einer bestimmten Relation zur jeweiligen Hautdurchblutungsgröße steht. In diesem Wellenbereich konnte die durch einen Histaminreiz ausgelöste Vasodilatation fluorometrisch in ihrer An- und Abstiegsflanke mitverfolgt werden. Ob dabei das Pyridinnukleotid NADH allein für die Fluoreszenzintensität des langwelligen Peaks verantwortlich ist oder ob weitere bisher unbekannte Faktoren dabei eine Rolle spielen, konnte nicht geklärt werden.

Die zweite Versuchsreihe sollte die Frage klären, ob die histamininduzierte Änderung der Hauteigenfluoreszenz durch Stoffe, die dieser Gefäßreaktion entgegenstehen, nachweisbar zu beeinflussen war. Obwohl durch fluorometrische Verlaufsbeobachtungen der relativen Fluoreszenzintensität des zweiten Hautpeaks ein gesetzter Hautdefekt bis zu seiner Heilung mitverfolgt werden konnte, wobei die Eigenfluoreszenz der intakten Hautoberfläche als Meßgröße verwendet wurde, scheiterte dieser Versuch einer Art Arzneimittelprüfung an der Eigenabsorption des dabei verwendeten Wirkstoffes besonders im Bereich des zweiten Gipfels.

Die dritte Versuchsreihe beinhaltete Messungen über einen Zeitraum von 22 Stunden am unveränderten und veränderten Stratum granulosum:

Die in der ersten Aufnahme vom unveränderten Stratum granulosum fast 100 % relative Fluoreszenzintensitäts-Zunahme machte deutlich, daß mit den Hornhautabrisse die meisten fluoreszenzlöschenden Substanzen entfernt wurden.

Die weiteren Zeitmessungen erbrachten einen konstanten relativen Fluoreszenzintensitäts-Rückgang, der wohl mit dem Aufbau eines neuen Barrierehäutchens in engem Zusammenhang steht.

Hinsichtlich des zweiten Peaks vom unveränderten Stratum granulosum ließen die Ergebnisse der einzelnen Zeitmessungen darauf schließen, daß die durch die Hornhautabrisse ausgelöste Freisetzung von körpereigenem Histamin zu dieser langanhaltenden lokalen Hautmehrdurchblutung geführt haben muß.

Bei Einwirkung von aqua destillata oder Histaminlösung 0,2 ppm wurde durch die entstehende Verdunstungskälte eine Vasodilatation kurzzeitig verhindert, was die erste Messung am veränderten Stratum granulosum mit einem leichten relativen Fluoreszenzintensitäts-Anstieg anzeigte. Die weiteren Zeitaufnahmen erbrachten dann einen konstanten relativen Fluoreszenzintensitäts-Abfall im Sinne einer zunehmenden Hautmehrdurchblutung, die nach 22 Stunden noch nicht ihren Abschluß gefunden hatte.

Unerwartete Ergebnisse hinsichtlich der relativen Fluoreszenzintensitäts-Veränderungen bei beiden Hautgipfeln brachte der Versuch mit Histaminlösung 1 ppm, weil eine Fluoreszenzzunahme gefunden wurde. Eine Erklärung dafür wurde in der Diskussion versucht.

VII. LITERATUR

- ACKERMANN A.: Über die Prüfung des lokalen orthosympathischen Tonuszustandes in der Haut mit Adrenalin-Elektrophorese. Münchner Med. Wochenschrift 83, 1876 - 1878 (1936)
- ATZINGER A.: Experimentelle Untersuchungen zum Fluoreszenzspektrum der menschlichen Haut. Med. Dissertation Universität München 1971
- BÖHM K.: Die Flavonoide: Eine Übersicht über ihre Physiologie, Pharmakodynamik und therapeutische Verwendung. Cantor, Aulendorff/Württemberg (1967)
- BRODY I.: An ultrastructural study on the role of keratohyalin granules in the keratinization process. J. Ultrastruct. Res. 3:84-104 (1959)
- COURBAT P., UHLMANN G. und GUERNE R.: Beitrag zur Untersuchung eines Produktes der beta-Hydroxy-äthylisierung von Rutosid, Wiss. Abt., Zyma-AG (1967)
- FITZGERALD D. E. et al.: The effect of hydroxyl-äthyl-rutoside on peripheral blood flow: a preliminary report, 5th Europ. Conf. Mikrocirculation Gothenburg 1968. Bibl. anat. No. 10: Karger, Basel - New York (1969)
- GALLY J. A. und EDELMANN G. M.: The effect of temperature on the fluorescence of some aromatic amino acids and proteins. Biochim. Biophys. acta 60, 499 (1962)
- GILDON N. u. M.D. BEALL: Plasma Histamine Concentrations in allergic Diseases: J. Allergy (1963)

- GOODMAN L. S. u. GILLMANN A.: The pharmacological basis of therapeutics, Mac Millan, New York, 1678 (1965)
- HANSEN K. u. WERNER M.: Lehrbuch der Klinischen Allergie, Thieme-Verlag, Stuttgart (1967)
- HARPER H. A.: Review of physiological chemistry, Lange Medical Publications, Los Altos, California Edition 12 (1969)
- HERRMANN F. et al.: Untersuchungen der Lipide in verschiedenen Bezirken der Hautoberfläche. Hautarzt 11 : 8, 60
- HOLZER U.: Der Beitrag des stratum corneum zur Hautoberflächenfluoreszenz. Med. Dissertation Universität München (1973)
- JORNS G.: Jontophorese bei chirurg. Krankheiten. Phys. Therapie 14, 103 (1962)
- KARLSON P.: Lehrbuch der Biochemie, Thieme-Verlag, Stuttgart (1964)
- KOWARSCHIK J.: Physikalische Therapie, Springer-Verlag Wien (1957)
- LENNART J.: Acta. derm. venereol. 47 : 383 - 391, Localization and Content of Histamin in normal and diseased skin (1967)
- LUND F., FAGRELLI, KUNICKI u. GLENN P.O.: The effect of O-(beta-Hydroxyäthyl)-Rutoside in postischämik and stasis Oedema of the rat tail, Edition Stenvert u. Zoow, Amsterdam (1968)

- MONTAGNA W. u. LOBITZ W.C.: The Epidermis, Academic Press, New York and London (1964)
- MOSER R.: Untersuchungen über die Verschiebung des neurovegetativen Tonus in der Haut bei der Solbadbehandlung. Diss. Zürich (1947)
- PINKUS H.: Examination of the epidermis by the strip method. II. Biometric data on regeneration of the human epidermis. J. Invest. Dermatol. 19 : 431 (1952)
- PRATZEL H.: Biochemische Vorgänge an der menschlichen Hautoberfläche. Nat. Dissertation Technische Universität München (1969)
- PRATZEL H.: Spektralfluorometrie der menschlichen Hautoberfläche. Teil I: Ein neuer Hautspektralfluorograph. Persönliche Mitteilung.
- RATTENHOFER M., SCHAUENSTEIN E. u. BERNDT W.: Histochemische und UV-spektrographische Untersuchungen an menschlichen Hautkeratinen. Z. f. Biologie 104 : 384 (1951)
- RILEY J. F. u. WEST G. B.: Skin histamine, its location in the tissue mast cells: Arch. Derm. 74: 471 (1956)
- SCHNEIDER M.: Einführung in die Physiologie des Menschen, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 16. Auflage (1971)
- SCHÜTZ E.: Lehrbuch der Physiologie, Urban - Schwarzenbeck, München - Berlin - Wien (1972)
- SCHWARZ E.: Abbau von Histidin zu Urocaninsäure in der Epidermis. Biochem. Zeitschr. 334:415 (1961)

- SIEGENTHALER W.: Klinische Pathophysiologie, Georg-thieme-Verlag, Stuttgart (1970)
- SZAKALL A.: Über den Verlust und Nachschub der hygroskopischen wasserlöslichen Inhaltsstoffe in der Hornschicht beim lebenden Menschen. Arch. klin. exp. Derm. 206: 374 (1957)
- SZAKALL A.: Hautphysiologische Forschung und Gesunderhaltung der Haut. Fette und Seifen 53, 399 (1951)
- UDENFRIED S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine Vol. II. Academic Press New York (1969)
- UVNÄS B.: Der Mechanismus der Histaminfreisetzung aus Mastzellen, Nannyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac., Bd. 250, Heft 2 (1965)
- ZACHARIAE H.: Skin Histamine in Erythema multiforme exsudativum, Acta. derm.-venereol. 44: 261 - 263 (1964)

Herrn Dr. H. PRATZEL und Herrn Prof. H. DREXEL
danke ich für die Überlassung des Themas.

Sie standen mir bei der Abfassung der Arbeit
mit Rat und Tat unterstützend zur Seite und
halfen mit viel Verständnis und Geduld, die
anfallenden Probleme zu lösen.

Herzlichen Dank sagen möchte ich auch allen
Angestellten des Instituts, die mir die Durch-
führung der Arbeit wesentlich erleichtert
haben.

LEBENS LAUF

Name: RADTKE Klaus, geb. 18. 4. 1940 in Berlin,
evangelisch, verheiratet

Eltern: Erich Radtke und Hedwig geb. Schulz

1946 - 1950 Volksschule in Schondorf am Ammersee

1950 - 1960 Königl. Bayr. Maximilians-Gymnasium
München

1960 - 1961 Wehrdienst in Fürstenfeldbruck und
Neubiberg

1961 - 1962 Maschinenbaustudium an der Technischen
Hochschule München

1962 - 1968 Medizinstudium an der Universität
München

1969 - 1970 Medizinalassistentenzeit beim Städti-
schen Krankenhaus Oberföhring und
Städtischen Krankenhaus Schwabing

ab 1971 Dissertationsarbeit am Balneologischen
Medizinischen Institut der Universität
München

Zwischenzeitlich Vertretungen von Land-
und Stadtpraxen allgemeinärztlicher
und fachärztlicher Richtung

ab 16.8.1974 Verwalter einer wissenschaftlichen
Assistentenstelle, Institut und Poli-
klinik für Physikalische Medizin,
München

